



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
ESPECIALIZACIÓN EN DIAGNÓSTICO VETERINARIO DE LABORATORIO

TRABAJO FINAL INTEGRADOR

TÍTULO: “Actualización en las técnicas de laboratorio y en la toma de muestras empleadas para el diagnóstico de brucelosis caprina”

ALUMNO: Merlo, Cintia Carolina

DIRECTOR: Miceli, Graciela

CO – DIRECTOR: Pidone, Claudio Luis

RESUMEN:

La brucelosis caprina es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa y zoonótica, de alto riesgo por el contacto con la vacuna o cepa a campo, constituyendo un peligro para la salud pública.

B. melitensis es un cocobacilo pequeño, Gram negativo del cual se conocen 3 biotipos (1, 2 y 3). Esta bacteria tiene la habilidad de multiplicarse dentro de las células fagocitarias del sistema inmune de su huésped. Al ser muy patógena produce infecciones cruzadas entre ovinos, bovinos, suinos, entre otros. Esta enfermedad tiene alta prevalencia produciendo grandes pérdidas económicas al disminuir la producción de carne y leche por abortos, y se agrava por la contaminación del ambiente debido a placentas eliminadas, fetos abortados y descargas vaginales.

El diagnóstico es de suma importancia ya que nos brindará la información necesaria para llevar a cabo un buen manejo, control y erradicación de la enfermedad de los hatos problemáticos. Este se basa en los hallazgos clínicos y de laboratorio, pues nos ofrece información certera sobre el agente etiológico, a nivel bacteriológico y serológico, mediante cultivos selectivos y por detección de anticuerpos específicos en suero o plasma. Es fundamental tener presente que las muestras a remitir deberán ser correctamente extraídas e identificadas, para obtener óptimos resultados.

Para un buen programa de vigilancia epidemiológica es indispensable un correcto manejo en sistemas extensivos y fundamentalmente la vacunación con cepa de *B. melitensis* Rev. 1, ya que esta reduce la eliminación de la bacteria al medio ambiente por parte de animales ya infectados.

ABSTRACT:

Caprine brucellosis is a highly contagious and zoonotic infectious disease, at high risk from contact with the vaccine or strain in the field, constituting a danger to public health.

B. melitensis is a small coconut bacillus, Gram negative of with 3 biotypes are known (1, 2 and 3). This bacterium has the ability to multiply within the phagocytic cells of the immune system of its host. Being very pathogenic, it causes cross infections among sheep, cattle, swine among others. This disease has high prevalence producing great economic losses by decreasing the production of meat and milk by abortions, and is aggravated by the contamination of the environment due to eliminated placentas, aborted fetuses and vaginal discharges.

The diagnosis is of great importance since it will provide us with the information necessary to carry out a good management, control and eradication of the disease of the herds problems. This will be based on a clinical and laboratory level, this being fundamental, which will provide us with accurate information about the agent requested, at the bacteriological and serological level, through selective cultures and by detection of specific antibodies in serum or plasma. It is essential to keep in mind that the samples to be sent must be correctly extracted and identified, in order to obtain optimal results. For a good epidemiological surveillance program, proper management is essential in extensive systems and fundamentally vaccination with *B. melitensis* strain Rev. 1, since it reduces the expulsion of the bacteria to the environment by animals already infected.

ÍNDICE

Resumen.....	2
Introducción.....	5
Agente etiológico - características del agente.....	5- 6
Aproximación al diagnóstico.....	7
Toma de muestras.....	9
Técnica de sangrado.....	10
Remisión de muestras.....	10
Pruebas Diagnósticas de Laboratorio.....	12
Rosa de Bengala.....	14
Antígeno Buferado en Placa.....	15
SAT (Wright) – 2 Mercaptoetanol.....	16 -18
ELISA – indirecto.....	19
ELISA – competición.....	20
Fijación del Complemento.....	21
Fluorescencia Polarizada.....	22
Vacunas.....	25
Propuesta de Manejo.....	26
Conclusión.....	29
Anexo n°1: protocolo envío de muestras al laboratorio.....	30
Bibliografía.....	32

INTRODUCCIÓN

AGENTE ETIOLÓGICO:

La brucelosis caprina es una enfermedad infecto – contagiosa de curso crónico causada por alguno de los tres *biovares* de *Brucella melitensis* (*B. melitensis*). En Argentina predomina el *biovar* 1 y la enfermedad afecta principalmente a los caprinos y ovinos que son huéspedes naturales y que cohabitan estrechamente entre ellos (Robles et al., 2014). La brucelosis al afectar a caprinos sexualmente maduros provoca abortos en el último tercio de la gestación en cabras y orquiepididimitis y artritis en los machos cabríos, induciendo un alto impacto en la producción caprina, la cual representa un rubro importante dentro del sistema agropecuario en el país, considerándose esta enfermedad el principal motivo de problemas reproductivos.

B. melitensis ingresa al organismo animal a través de las membranas mucosas lo que le permite llegar a la submucosa, donde entra en contacto por primera vez, con el sistema inmune, generando una reacción inflamatoria aguda donde la bacteria puede ser rechazada por el organismo o por el contrario progresar hacia la próxima etapa. Las *brucellas* llegan hasta los ganglios linfáticos de la región entre los 4 y 10 días post infección. Como la vía más común de entrada de *B. melitensis* es la vía oral/digestiva, los linfonodos del cuello y cabeza son los que generalmente se infectan al inicio. Si el organismo falla en destruir las *brucellas* en los ganglios linfáticos, se establece una infección persistente. A los 15 días post inoculación, *B. melitensis* puede ser aislada de bazo y entre los 22 a 29 días, se la puede aislar de ganglios linfáticos distales, ubre y útero gestante en la hembra. En el macho se la puede aislar de linfonodos, testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias. En la hembra cuando hay infección de útero y placenta se produce el aborto (Robles, 2009).

Es una enfermedad zoonótica con alto impacto en la salud pública que afecta especialmente a poblaciones humanas vulnerables, de escasos recursos que viven en zonas alejadas de centros urbanos y de asistencia, afectando, además, la productividad de los hatos caprinos y su economía en la República Argentina (SENASA, 2017). El humano se contagia por el estrecho contacto entre la familia y los animales, y los consumidores por la ingestión de productos y subproductos (leche cruda y/o sus derivados no pasteurizados) causando la Fiebre ondulante o Fiebre de Malta. Las

manifestaciones clínicas tienden a la cronicidad, caracterizándose por fiebre (continua o intermitente), mialgias, artritis, epididimitis, entre otras (Moral, 2013).

La distribución de la infección por *B. melitensis* en caprinos es mundial, se determina el nivel de prevalencia de la enfermedad para regionalizar su situación sanitaria y administrativa, en el país no es homogénea siendo la prevalencia alta en provincias como Mendoza, San Juan, La Rioja, Catamarca, Salta y Formosa. Y bajas en el NOA (Noroeste Argentino), otras aparentemente libres como la Patagonia, Buenos Aires, La Pampa, Corrientes y Entre Ríos (Tabla N°1). En los últimos años se realizaron numerosos muestreos y relevamientos serológicos en caprinos en distintas regiones del país, llevados a cabo por Universidades, INTA, SENASA, etc., con el fin de caracterizar mejor la distribución y la prevalencia de la enfermedad y promover el control de la misma, que en su mayoría, está asociada a pequeños productores en situación de subsistencia (Robles et al., 2014).

Tabla N° 1: Valores de seroprevalencia de la brucelosis caprina en las 3 regiones que definen el estatus sanitario de la República Argentina (Robles et al.,2014).

Estatus	Seroprevalencia (%)	Caprinos N°	Distritos N°
Alta prevalencia ≥2,5	31,6	1.344.470	34
Media prevalencia ≤2,5	9,8	622.395	47
Libres 0	38,1	1.619.483	273
Total		3.586.348	354

Características del agente:

B. melitensis es un cocobacilo pequeño, Gram negativo conociéndose tres biotipos (1, 2 y 3). Esta bacteria tiene la habilidad de multiplicarse dentro de las células fagocitarias del sistema inmune de su huésped.

Posee una compleja envoltura celular compuesta por un espacio periplásmico y una membrana externa, dentro de los componentes de esta membrana se encuentran: el Lipopolisacárido (LPS) que está formado por tres elementos: el Lípido A, núcleo y la cadena O, encontrándose en la parte externa de la bacteria. La cadena O posee características antigénicas responsable de generar una respuesta inmune y es la que interviene en la reacción antígeno anticuerpo cuando se realizan las pruebas serológicas diagnósticas como el BPA, rosa de Bengala, ELISA, etc. Los haptenos nativos y Polisacárido B (HN y Poli B) están compuestas por cadenas de polisacáridos semejantes a la cadena O del LPS pero no están unidos a otros azúcares o al lípido A. Algunas de las proteínas de la membrana externa (PME) han sido útiles como antígenos en pruebas diagnósticas y también como inmunógenos para el desarrollo de vacunas subcelulares que no interfieran con las pruebas de diagnósticos más usuales (Robles, 2009).

APROXIMACIÓN AL DIAGNÓSTICO:

Para poder llegar a un diagnóstico debemos recolectar información necesaria para luego analizarla, teniendo en cuenta que debemos correlacionar 3 tipos de diagnósticos: clínico (anamnesis para abordar un diagnóstico clínico presuntivo), detección del agente en muestras biológicas (en lesiones de los individuos afectados) y fundamentalmente de laboratorio (detección de anticuerpos específicos). Este último es el que nos va a permitir detectar de forma directa o indirecta el agente causal, pudiéndose realizar de manera individual o poblacional (Di cola, 2014).

El diagnóstico se puede realizar en tres niveles:

- I. Diagnóstico clínico
- II. Detección del agente en muestras biológicas
- III. Detección de anticuerpos específicos

I. El diagnóstico clínico, en la hembra gestante hay aborto en el último tercio de la gestación haciendo sospechar en primera instancia de brucelosis, y a nivel de los cotiledones de la placenta hay lesiones de necrosis. En machos la presencia de orquitis es el principal signo compatible con brucelosis y semen de mala calidad (observado en laboratorio).

II. Detección del agente en muestras biológicas: *bacterioscopia*, tinción de frotis o improntas a partir de órganos y fluidos infectados como hisopados de flujo vaginal. En fetos abortados las improntas se realizan a partir de contenido de cuajo, hígado, bazo y pulmón. Las coloraciones se pueden teñir con Gram o Stamp.

Aislamiento por cultivo, las muestras de preferencia son: *muestras de la hembra abortada*, se efectúan hisopados vaginales lo más cercano al aborto o parto; muestras de leche en recipiente estéril; en caso de muerte del animal se ejecuta la necropsia correspondiente intentando tomar muestras a partir de ganglios linfáticos retromamarios e iliacos, útero, ubre, bazo, hígado, etc. *Muestras del feto y envolturas*, muestra de placenta en especial los cotiledones afectados en recipiente estéril; contenido del cuajo en jeringa estéril y líquido torácico del feto abortado; trozo de hígado, bazo y pulmón en recipiente estéril. Para el aislamiento de *B. melitensis* se pueden utilizar medios comunes como el agar base, el agar tripticasa – soya o el agar *brucella* adicionados con un 5-7% de sangre o suero.

III. Detección de anticuerpos específicos, para determinar el porcentaje de animales infectados que tenemos en un hato se recurre a un método indirecto de diagnóstico como es la detección de anticuerpos *antibrucella* en el suero sanguíneo o leche de los animales (Robles, 2009).

Las pruebas disponibles para el serodiagnóstico de brucelosis caprina en el mundo son (Robles et al., 2014):

- BPA (antígeno bufferado en placa)
- RB (Rosa de Bengala)
- ELISA -I (ELISA indirecto en suero o leche)
- SAT (Aglutinación lenta en tubo)
- 2 ME (Aglutinación en tubo con 2 mercapto-etanol)
- FC (Fijación del Complemento)
- ELISA -C (ELISA de competición)
- FPA (Fluorescencia polarizada)

El tipo de respuesta inmune que detectan estas pruebas es humoral, las más utilizadas son las del BPA y RB modificada, por su sencillez, rapidez de ejecución y bajo costo. Las pruebas confirmatorias son SAT - 2 ME, FC y ELISA de competición fueron desarrolladas originalmente para su uso en bovinos por lo que deberán ajustarse para su uso en

caprinos y sus valores de corte, según sea un área con o sin vacunación con vacuna REV – 1. Las pruebas de ELISA del tipo indirecto y de competición se utilizan para diferenciar anticuerpos vacunales de anticuerpos generados por la infección a campo.

TOMA DE MUESTRAS:

Correcta preparación del material a utilizar para la extracción de sangre:

Los tubos de ensayo tipo Vacutainer que se vayan a utilizar deben estar limpios, caso contrario el lavado de tubos ya utilizados se deben dejar en remojo y desinfección por un día en lavandina, luego lavar con cepillo, agua y detergente, enjuagar varias veces hasta que no queden restos de detergente. Dejar secar boca abajo en una gradilla a temperatura ambiente. Colocar tapa de plástico o tapón de goma y rotular con etiqueta autoadhesiva y escribir con marcador indeleble. (Robles, 2009).

Debemos tener en cuenta requisitos mínimos para la recolección de muestras (sangre – suero), tales como:

1. No colocar el bisel de la aguja hacia abajo pues imposibilita el paso de sangre.
2. No usar agujas húmedas ya que se hemolizan los glóbulos rojos.
3. Retirar la aguja de la jeringa antes de llenar el tubo donde se deposita la sangre para evitar hemólisis.
4. Utilizar preferentemente el sistema de tubos al vacío (tipo Vacutainer), que por ser un sistema cerrado presta mayor garantía en cuanto a asepsia y preservación de las muestras, o tubos limpios estériles y secos.
5. Los tubos tipo Vacutainer sin anticoagulante, representan un menor riesgo de hemólisis de las muestras, con respecto al sistema de extracción con jeringa (SENASA, 2005).

Técnica de sangrado:

Las muestras de sangre se recolectan en tubos que luego puedan ser centrifugados, si es que el suero no se separó en forma espontánea. La extracción de sangre de 2,5 a 3 mL para obtener 1 mL de suero, debe realizarse en condiciones estériles, en un vaso sanguíneo accesible y suficientemente grueso para obtener un caudal adecuado a la cantidad de sangre a extraer (vena yugular). Con el animal en pie y utilizando un rincón del corral, se lo toma por la cabeza y se levanta levemente hacia arriba y a la derecha. El operario se coloca en cuclillas delante del animal y provisto de un tubo de sangrar y una aguja hipodérmica descartable (50 x 20), sangra al animal. Se debe comprimir con la mano izquierda la vena yugular a nivel de la entrada del pecho y esperar que esta se ingurgite. Luego con los dedos mayor y anular de la mano derecha se palpa la zona hasta que se detecta la vena tensa, sin disminuir la presión procedemos a clavar la aguja, con el bisel hacia arriba. Una vez que ingresamos en la vena y comience a salir sangre colocamos el tubo para recolectarla, este debe mantenerse inclinado para que la sangre deslice por un costado del mismo a fin de que el suero no se hemolice por la ruptura de los glóbulos rojos al golpear contra el fondo del tubo, así mismo evitamos la formación de espuma que posteriormente va a retardar la separación del coágulo y del suero. Antes de tomar la muestra de sangre el tubo tiene que estar tibio, se deberá mantener los tubos en una gradilla dentro de una caja de telgopor donde previamente hemos colocado una bolsa de agua caliente en el fondo. Llenar el tubo de sangre en sus 2 tercios y colocarlo en la gradilla. Mantener a un costado un balde con agua con desinfectante para la higiene de las manos y materiales durante el trabajo, (Robles, 2009).

REMISIÓN DE MUESTRAS:

Es importante tener en cuenta que las condiciones de envío y su conservación son factores claves para interpretar correctamente los resultados analíticos.

El profesional de campo tiene la responsabilidad de seleccionar, recolectar, preservar y enviar adecuadamente al laboratorio las muestras para el diagnóstico.

En términos generales, toda muestra debe ser remitida con su historia clínica completa y perfectamente identificada, en su protocolo debe contener datos de los antecedentes de los animales tales como procedencia de las muestras y signos clínicos, edad, categoría y la explotación de origen de los mismos. Los envases utilizados para el envío de muestras deben ser en lo posible irrompibles, herméticos y de dimensiones adecuadas, estos deben evitar el movimiento de los tubos. El tiempo entre la obtención de la muestra y su llegada al laboratorio no debe extenderse más de 24 horas.

Protocolo (datos que se sugieren completar):

1. Nombre y Apellido, dirección, e-mail, teléfono del Médico Veterinario.
2. Nombre y Apellido, dirección, e-mail, teléfono del propietario.
3. Nombre de la explotación pecuaria.
4. Ubicación: provincia, departamento, localidad.
5. Especie, raza, sexo, edad e identificación del/los animales .
6. Porcentaje de morbilidad (enfermos) y mortalidad (muertos).
7. Signología.
8. Tiempo de evolución de la enfermedad.
9. Tratamiento efectuado.
10. Vacunas aplicadas (tipo, lote y fecha de aplicación).
11. Tipo de muestra, fecha y hora de la toma.
12. ¿Qué categoría de animales se sangraron?
13. Sistema de conservación utilizado (refrigeración con hielo natural, hielo seco o gel refrigerante en bolsas herméticas).
14. Diagnóstico presuntivo.
15. Observaciones.

Para el transporte el envase debe ir etiquetado y rotulado como material patológico animal – perecedero – FRÁGIL – No abrir fuera de un laboratorio (SENASA 2005).

Obtención, acondicionamiento y conservación del suero:

Luego de unas horas de reposo a temperatura no inferior a 20 °C el coágulo se retrae, liberando el suero. Separar el suero en un tubito plástico tipo eppendorf (máximo de 24 horas de extraída la sangre, de lo contrario el suero entra rápidamente en descomposición y los resultados de las pruebas no son confiables), congelar a -20°C hasta su envío al laboratorio con refrigerantes, adjuntando planilla de campo con los datos del establecimiento y de los animales.

Si en algún tubo, no se obtuvo suero, centrifugar a 1500/2000 rpm por 15 minutos (Robles et al., 2011).

Los errores más frecuentes en la obtención de sueros a partir de muestras de sangre son:

- Los tubos contienen escasa muestra y no libera suero. Debido a diversos factores como bajas temperaturas después de la extracción de la muestra, tubos mal lavados.
- Tubos muy llenos con retracción parcial del coágulo y liberación.
- Tubos con coágulo parcialmente retraído y suero hemolizado.

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LABORATORIO:

Para poder determinar la presencia de la enfermedad se realizan diferentes métodos y técnicas, que van desde las más habituales y convencionales como así también las más actualizadas.

El examen bacteriológico, a partir de tejidos, sangre y leche no resulta practicable debido a que es laborioso y no siempre se logra.

El cuadro clínico no es patognomónico, de tal forma que el diagnóstico definitivo de infección por *B. melitensis* sólo puede realizarse a partir del aislamiento e identificación de ésta, pero en situaciones en las que no es posible el análisis bacteriológico, el diagnóstico

debe basarse en los métodos serológicos (Manual OIE, 2018). Estos nos permiten hacer un diagnóstico poblacional, procesar grandes cantidades de muestras a bajo costo y menor tiempo.

Pruebas tamiz: BPA

RB modificado

Alternativa: ELISA indirecto

Pruebas confirmatorias: FPA- ELISA-c

FC - 2 ME (se descartan falsos positivos)

Todas estas pruebas tienen sus limitaciones, para una interpretación diagnóstica concreta se deben tener en cuenta todos los factores que influyen en la idoneidad del método analítico y en los resultados de este (Díaz et al., 1994).

La prueba de RB y la prueba de BPA, así como el ELISA indirecto se consideran pruebas tamiz, para el control de la brucelosis a nivel nacional o local. Aquellas reacciones que sean positivas deben comprobarse de nuevo utilizando un método confirmativo o complementario adecuado. La prueba SAT en general se considera inadecuada a efectos del comercio internacional. La prueba de FC es más específica que la SAT y además posee un sistema estandarizado de concepto unitario. La sensibilidad de la prueba de RB es del 78,9 %, en tanto que, para BPA, ELISA y 2 ME es del 98%, mientras que la especificidad resultó del 97% para las 4 pruebas mencionadas (Segovia et al., 2000). Ninguna prueba serológica es 100% sensible o específica, sólo lo es, el aislamiento del agente.

Las características de rendimiento diagnóstico de algunos ELISA y de la prueba de FPA son similares o superiores a las de FC y, como son técnicamente más fáciles de ejecutar y más robustas, pueden ser preferibles.

Pruebas tamiz con antígeno tamponado en placa:

Pruebas tamiz de aglutinación en placa. Detectan anticuerpos IgG y algunos IgM específicos (Manual OIE, 2018).

ROSA DE BENGALA (RB): prescrita para el comercio internacional.

Prueba sencilla de aglutinación que utiliza antígeno coloreado con rosa de bengala y tamponado a pH bajo de 3,65 +/- 0,05. Se basa en la inhibición, inactivación de algunas aglutininas inespecíficas. Es cualitativa muy sensible que detecta IgG y su positividad va a persistir por mucho tiempo. A veces puede originar reacción positiva debido a vacunación con cepa Rev- 1 de *B. melitensis*.

Técnica:

- Las muestras de suero y el antígeno deben estar a temperatura ambiente, 22°C. Preparar la cantidad de antígeno necesario para las muestras del día.
- En aglutinoscopio, se depositan 25 µL de suero por cuadrícula, para RB estándar.

Para RB modificada 80 µL de suero.

- Se agita el frasco de antígeno suavemente y se deposita 30 µL de antígeno cerca de cada gota de suero.
- Luego se mezclan cuidadosamente el suero y el antígeno, usando una varilla de plástico por cada prueba, hasta realizar una zona circular de 2 cm de diámetro aproximadamente.
- Agitar la mezcla suavemente durante 4 minutos a temperatura ambiente.
- Se comprueba la aglutinación a los 4 minutos. Es positiva si hay presencia de grumos (Foto N°1).
- Analizar un suero control positivo para comprobar la sensibilidad de las condiciones de la prueba.



Foto N°1: a la izquierda se observa el frasco del antígeno Rosa de Bengala. A la derecha se muestra una aglutinación positiva.

ANTÍGENO BUFERADO EN PLACA (BPA): Prueba prescrita para el comercio internacional.

Esta prueba es muy sensible para la detección de anticuerpos inducidos por cepas vacunales y las muestras positivas deben volver a analizarse con pruebas confirmatorias y/o complementarias. Pueden producirse falsos negativos, debido a los fenómenos prozona, que se le eliminan diluyendo el suero o analizando nuevamente después de cierto tiempo.

Técnica:

- Llevar las muestras de suero y el antígeno a temperatura ambiente, 22°C. Sacar el antígeno necesario de la heladera solo para las muestras del día.
- Se agita bien la muestra. Se depositan 80 μ L de suero en un aglutinoscopio (placa de vidrio marcada con cuadros de 4 x 4 cm).
- Agitar bien el antígeno, pero suavemente y se depositan 30 μ L de antígeno cerca de cada gota de suero.
- Mezclar completamente el suero y el antígeno, usando una varilla de plástico por cada muestra, hasta producir una zona circular de 3 cm de diámetro.
- Rotar la placa tres veces con inclinación para asegurar la homogeneidad de los reactivos e incubar 4 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- Extraer la placa y rotarla nuevamente, volver a incubar otros 4 minutos.
- Realizar la lectura transcurridos los 8 minutos: La presencia de grumos se considera una reacción positiva (Foto N°2).
- Analizar un suero control positivo para comprobar la sensibilidad de las condiciones de la prueba.



Foto N° 2: Prueba de BPA, a la izquierda se observa frasco con antígeno brucélico. A la derecha se muestran sueros con aglutinación positiva.

Pruebas de seroaglutinación lenta en tubo:

Detectan la presencia de anticuerpos IgG e IgM (SAT) y solo IgG (2Me). El título del suero se determina por la más alta dilución que produce cierto grado de aglutinación (Manual OIE, 2018).

SAT (Wright):

Esta prueba se emplea cuando se desea conocer el contenido total de anticuerpos brucélicos en suero, en Unidades Internacionales por mililitro de suero (UI/mL). Esta puede resultar negativa en animales con infección reciente, que todavía no tienen anticuerpos IgG pero sí IgM en 100 UI o más.

2 - ME:

El 2 ME se basa en la propiedad química de degradar los anticuerpos IgM, por lo tanto es una prueba selectiva cuantitativa que detecta solamente las IgG existentes en suero.

Reactivos a utilizar para la preparación de soluciones:

- ☐ Antígeno, concentrado al 4,5 % de Brucellas.
- ☐ Suero problema
- ☐ Solución fisiológica
- ☐ Solución salina fenolada al 5%
- ☐ Solución 2 - ME 0,1 M.

Preparación:

- ☐ Antígeno: 2 mL de éste e incorporar 98 mL de solución fisiológica.

- ❑ Solución fisiológica: 8,5 grs de cloruro de sodio en agua destilada csp 1.000 mL.
- ❑ Solución salina fenolada: 5 mL de fenol más 95 mL de solución fisiológica.
- ❑ Solución 2 – ME: esta solución es sensible a la luz, al aire y al calor por lo que debe conservarse en frasco color caramelo entre 4° y 8°c y luego de una semana se descarta. Para obtener una solución 0,1 M se agrega a 100 mL de solución fisiológica 0,78 mL de 2- ME solución madre.

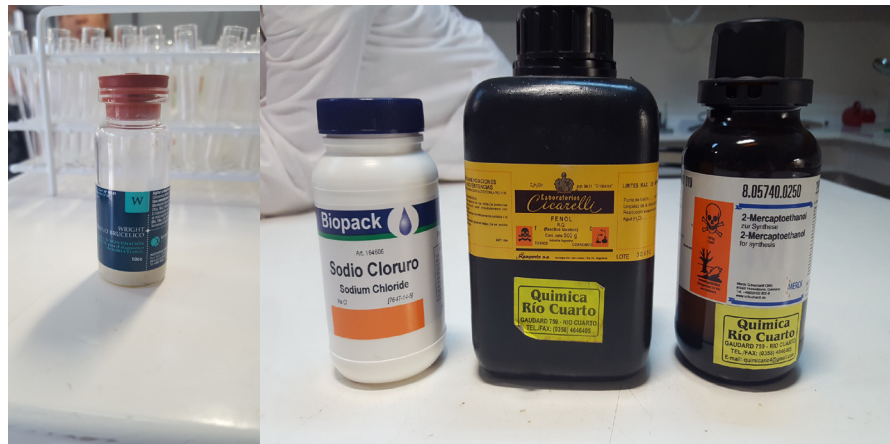


Foto N° 3: Prueba de 2 ME, a la izquierda se observa el antígeno brucélico. A la derecha se muestran los reactivos para preparar soluciones.

Técnica:

- En una gradilla se colocan los tubos, para SAT una fila y otra fila para 2- ME (de 4 tubos cada fila).
- Cargar el suero con una pipeta y descargar en los tubos: 80 μ L para los primeros tubos, 40 μ L en los segundos, 20 μ L en los terceros y 10 μ L en los cuartos.
- Agregar en la primera hilera: 1 mL de solución salina fenolada (para SAT) y en la segunda hilera 1 mL de solución de 2 – ME 0,1 M, agitar la gradilla para mezclar bien.
- Las diluciones serán: primer tubo 1/25 – segundo tubo 1/50 – tercer tubo 1/100 y cuarto tubo 1/200. Estas mezclas deben reposar 1 hora a temperatura ambiente. En cada tubo agregar 1 mL de antígeno al 2% y mezclar bien (el 2 ME fragmentará los puentes disulfuro de las IgM).
- Colocar un tubo sin suero y con 2 mL de antígeno sirve como testigo para el control del antígeno. También es necesario colocar un tubo con suero que en SAT

aglutine con títulos de 1/200 y sea negativo para 2-ME, con esto controlaremos la solución de 2-ME.

- Incubar a 37,5°C en estufa por 48 horas.
- La lectura se realiza contra un fondo negro opaco pero con luz fuerte que atraviese los tubos.
- Interpretación de las reacciones: *Negativa (-)*: la mezcla suero/antígeno no es clara y una suave agitación no revela grumos.

Positiva (+): la mezcla suero/antígeno es claro y una suave agitación suspende los grumos sedimentados sin romperlos. En la dilución $SAT \geq 1/50$, $2ME \geq 1/25$, donde se realiza la lectura en conjunto, los animales se consideran infectados. (Cisterna y col.).

Incompleta (I): la mezcla suero/antígeno es parcialmente clara y una suave agitación suspende los grumos sedimentados y algunos se disgregan por completo.

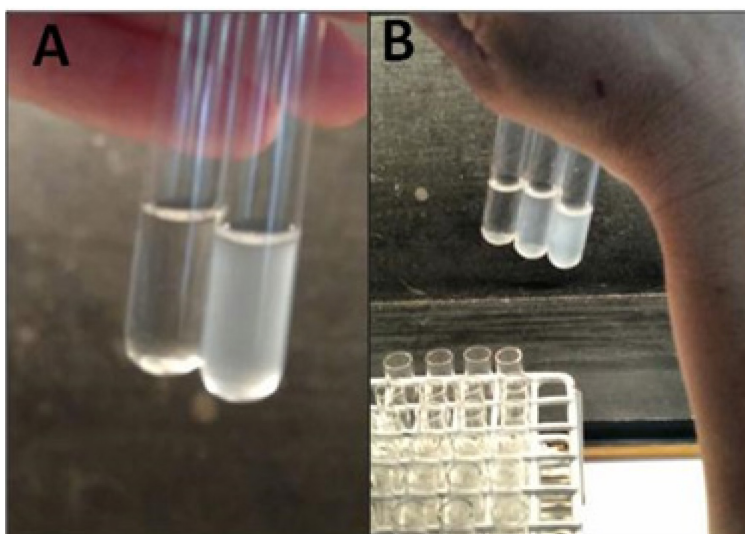


Foto N°4. Lectura de las reacciones en la prueba de 2 ME. En A de izquierda a derecha, tubo positivo y negativo. En B de izquierda a derecha tubo positivo, incompleto y negativo.

Enzimoimmunoanálisis: Prescrita para el comercio internacional (pruebas que se consideran óptimas para determinar el estado sanitario de los animales antes de exportarlos). Esta técnica es altamente sensible, específica, versátil y es ampliamente utilizada en medicina veterinaria para el diagnóstico de diferentes enfermedades. El principio de esta prueba se basa, en un antígeno inmovilizado en una placa, que se

detecta por anticuerpos unidos a una enzima, la cual dará o no una reacción de color, que será detectado por un espectrofotómetro, la utilización de un anticuerpo monoclonal, el cual compite diferencialmente con los anticuerpos producidos en la respuesta a la vacunación, son utilizados en el ELISA indirecto (ELISA -I) o ELISA de competición (ELISA - C) (Robles, 2001).

ELISA INDIRECTO (ELISA – I)

Es una prueba muy sensible detecta presencia de anticuerpos anti *Brucella* tanto en animales salvajes como domésticos, pero no diferencia anticuerpos originados por vacunación. Utiliza diversos preparados antigénicos (cepa 16M de *B. melitensis*, cepa 99 de *Brucella abortus*, célula entera, lipopolisacárido liso (sLPS), polisacárido (OPS)), así como conjugados de antiglobulinas con enzimas y varios sustratos/cromógenos. Se dispone de varios ELISA – I comerciales, pero tanto la técnica utilizada como los resultados deben validarse de acuerdo a los principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas (Manual OIE, 2018).

Las reacciones positivas deberán comprobarse con pruebas confirmatorias o complementarias como FC.

Técnica:

- En cada placa se incluyen un control positivo y uno negativo. Establecer los intervalos de densidad óptica (DO), obteniéndose con estos dos controles la validación de resultados de cada placa.
- La densidad óptica del control positivo es con la cual se compara cada suero problema para determinar el resultado, ya sea positivo o negativo.
- En cada placa debe incluirse un suero positivo adicional de control interno, validando así la repetibilidad de la prueba entre placas y entre días.

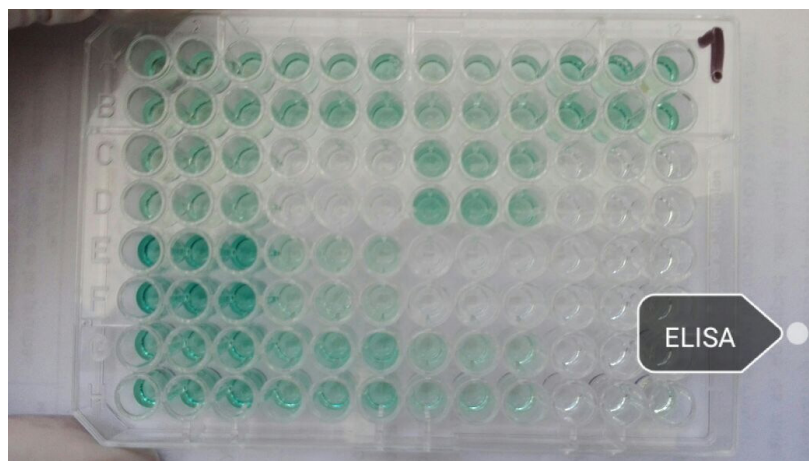


Foto N°5: Placa de ELISA – I lista para su lectura, en espectrofotómetro.

ELISA de competición (ELISA – C):

Existen diversas variaciones de ELISA-C, donde incluyen distintos conjugados anti globulina – enzima, sustratos o cromógenos y antígenos preparados a partir de cepas lisas de *Brucella*. Además reduce aunque no del todo, las reacciones causadas por anticuerpos producidos en respuesta a la vacunación (Manual OIE, 2018).

Técnica:

- Incluir un control positivo y uno negativo en cada placa. Deberá establecerse los intervalos de DO, para definir y validar los resultados de cada placa.
- La DO del control positivo es con la cual se compara cada suero problema para determinar el resultado, ya sea positivo o negativo.
- En cada placa debe incluirse un suero positivo adicional de control interno, validando así la repetibilidad de la prueba entre placas y entre días.

FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO (FC):

Prueba muy utilizada pero de difícil ejecución, requiere de buenas instalaciones y de formación específica del personal para titular y conservar los reactivos adecuadamente. Se usa el formato de microtitulación (Manual OIE, 2018).

Es muy específica pero menos sensible que RB y ELISA.

Para la incubación de suero, antígeno y complemento se utiliza la fijación en caliente (37° C durante 30 minutos) o en frío (5° C durante 14 – 18 horas).

Técnica:

Los sueros problema sin diluir y los estándares de trabajo adecuados se inactivan durante 30 minutos en un baño de agua a 60°C, si fueron diluidos a la mitad con solución salina tamponada con veronal, se inactivan a 58°C durante 50 minutos.

- Utilización de placas de microtitulación estándar de 96 pocillos de fondo redondeado.
- En el pocillo de la primera, segunda y tercera fila, se depositan 25 µL de suero problema inactivado diluido.
- La primera fila es control anti complementario para cada suero, añadiendo a esa fila 25 µL de tampón de FC (controles anticomplementarios) para compensar la falta de antígeno.
- A todos los demás pocillos se añaden 25 µL de tampón de FC menos a la segunda fila.

- Realizar diluciones seriadas a la mitad, transfiriendo volúmenes de 25 µL de suero desde la tercera fila en adelante.
- Descartar 25 µL de la mezcla resultante en la última fila.
- Añadir 25 µL de antígeno a cada pocillo, diluido a la concentración de trabajo, a excepción de la primera fila.
- Añadir 25 µL de complemento diluido hasta el número de unidades exigido.
- Los controles deben contener un volumen de 75 µL totales (diluyente, complemento + diluyente, antígeno + complemento + diluyente).
- Incubar las placas a 37°C durante 30 minutos o toda la noche a 5°C añadiendo un volumen de SRBC sensibilizados a cada pocillo. Re incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Centrifugar las placas a 1000 g durante 10 minutos a 5°C o dejarlas en reposo por 2 – 3 horas, para que sedimenten las células no lisadas. El grado de hemólisis se compara con los estándares que correspondan a una lisis del 0, 25, 50, 75 y 100% de lisis.
- Sueros con títulos equivalentes a 20 UIFC/mL se consideran positivos. Animales vacunados entre 3 y 6 meses son positivos si los sueros dan una fijación positiva con un título de 30 o más UIFC/mL.

POLARIZACIÓN FLUORESCENTE (FPA):

Es una técnica sencilla que determina la interacción antígeno/anticuerpo, es rápida debido a que no requiere la separación de los analitos ya que es una prueba homogénea. Precisa de una lectura blanco/fondo para cada muestra antes de añadir el antígeno, solo consta de dos pasos (Manual OIE, 2018).

La sensibilidad y especificidad son casi idénticas a las de ELISA-C. Este ensayo permite reducir reacciones de anticuerpos residuales producidos por vacunación. Es una prueba confirmatoria. Puede ser fácilmente automatizada, ya que después de mezclar el antígeno marcado y el suero la lectura es casi instantánea. La especificidad varía entre 98,8 % y 99,0 %. Esta prueba ya se utiliza en los programas de control y certificación de brucelosis en América del Norte y Europa. La OIE considera esta prueba como una "prueba prescrita para comercio internacional" (Godfroid, Nielsen, &

Saegerman, 2010). Esta técnica fue desarrollada y validada para caprinos y otras especies, siendo una prueba oficial aprobada por SENASA.

Técnica:

- Puede realizarse en tubos de vidrio o placas de 96 pocillos.
- Los sueros caprinos se diluyen a 1/10 para prueba en placa o a 1/25 para prueba en tubo.
- Diluyente es Tris 0,01 M (1,21 g), con cloruro de sodio 0,15 M (8,5 g), Igepal CA630 al 0,05% (500 µL) y EDTA 10 mM (3,73 g) por litro de agua purificada, pH 7,2 (tampón Tris).

Volúmenes recomendados para caprinos:

- Se coloca 960 µL de buffer en tubo de vidrio por cada muestra a probar.
- Se colocan 40 µL de suero problema.
- Agitar vigorosamente por medio de un vortex.
- Dejar reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- Introducir el tubo en el polarímetro para obtener la lectura blanco.
- Retirar el tubo y adicionar 10 µL de antígeno brucélico.
- Agitar vigorosamente por medio de un vortex.
- Dejar reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- Reintroducir el tubo en el polarímetro para hacer la lectura, registrar las diferencias entre las lecturas obtenidas.
- Lectura inicial para determinar la dispersión de la luz se obtiene con el analizador de fluorescencia polarizada.
- La lectura es en unidades de minipolarización (mP), cuando está por encima del umbral o punto de corte establecido indica reacción positiva. En caprinos la muestra positiva debe ser >85 mP (SENASA & OIE, 2009).



Foto N°6: Polarímetro de fluorescencia polarizada.

Tabla N°2: se resumen ciertas características de la capacidad diagnóstica de las pruebas serológicas mencionadas en este trabajo.

Método (detectan respuesta inmunitaria)	Comprobar ausencia de infección en la población	Comprobar ausencia de infección en casos aislados	Contribuir a la erradicación de la enfermedad	Confirmar casos clínicos sospechosos	Establecer prevalencia de infección/ vigilancia del rebaño
BPA/RB	+++	++	+++	+	+++
FPA	++	++	+	++	++
FC	++	++	+++	++	+++
ELISA – I	+++	++	+++	++	+++
ELISA – C	++	+	+	+	++
SAT – 2 Me	++	+	+	-	+

+++ : Prueba recomendada, ++ : prueba adecuada, + : utilización en algunos casos (por su costo y fiabilidad), - : prueba no adecuada. (Manual OIE, 2018).

VACUNAS:

Donde se registran altas tasas de prevalencia de *B. melitensis*, la estrategia de “diagnóstico y sacrificio” no es suficiente para controlar y erradicar la brucelosis. La vacunación es una herramienta básica y acompañada de un estricto esquema de vigilancia es primordial para reducir el número de animales infectados e incrementar la inmunidad a nivel poblacional (Minas, 2016).

La vacuna *B. melitensis*, biotipo 1, cepa Rev.1 es a germen vivo atenuado (desarrollada por Elberg y col.), para su uso en ovinos y caprinos. Es estable y tiene escasa virulencia, pero es patógena para el ser humano y si se aplica a cabras gestantes, induce el aborto, se excreta en leche e interfiere con la serología diagnóstica. Es una cepa mutante, que proviene de la cepa virulenta *B. melitensis* 6056 que posee características bacteriológicas especiales, que permiten diferenciarla de las cepas patógenas de *B. melitensis*. Esta cepa viva atenuada al ser inoculada, se multiplica en el animal produciendo una infección controlada, ya que coloniza los ganglios linfáticos craneales y cursa con inflamación granulomatosa generalizada que luego involuciona y con fiebre que persiste hasta el décimo día post inoculación.

Es necesario interrumpir el contagio y la diseminación de Brucelosis en la población caprina y ovina en el país y la generación de casos humanos. Se realiza la vacunación masiva y sistemática a todo el stock caprino a partir de los 3 a 6 meses de edad (a excepción de las hembras gestantes) con dosis completa por vía conjuntival, con lo que se logra la protección inmediata de todos los animales, sin inducir respuesta de anticuerpos persistentes, y la interferencia con la serología diagnóstica no va más allá de los 6 meses. Hay un control efectivo de la enfermedad y de la inmunidad sólida y duradera del hato que se puede mantener vacunando a la reposición. Es una vacuna de elección para ser utilizada en un programa de control de brucelosis caprina.

Contraindicaciones de la vacuna Rev.1: esta posee las mismas ventajas y desventajas que la Cepa 19 que se usa en bovinos. No es inocua y conserva cierto grado de patogenicidad, por ello su uso está restringido a cabrillas, cabras adultas no preñadas y machos cabríos. En caso de vacunar hembras preñadas existe riesgo de inducir aborto con la consiguiente contaminación del ambiente por la eliminación de *brucellas* viables en fetos, membranas placentarias y la eliminación de la cepa vacunal por leche en las hembras abortadas. Los abortos ocurren entre los 30 y 60 días pos vacunación (Robles et al., 2014).

Vacuna *B. melitensis* Cepa 53- H- 38: vacuna inactivada, está en desuso por la persistencia de anticuerpos vacunales y reacciones inflamatorias en el lugar de inoculación.

Vacuna *B. melitensis* Cepa M111: su eficacia es del 78% en caprinos y se aplica en forma inyectable u oral, reduce la tasa de abortos en un 50% a valores mínimos en el término de 2 años. Fue desarrollada en China.

PROPUESTA DE MANEJO:

Se deben considerar diversas estrategias para cada provincia o región en cuanto al control, eliminación y erradicación de brucelosis caprina y ovina, como la vacunación para disminuir la susceptibilidad individual y poblacional, identificación de animales, determinación de estatus sanitario, control de movimientos, eliminación de

animales enfermos y vigilancia epidemiológica para detectar animales reaccionantes y hatos de donde provienen.

El sector caprino es asistido por el Estado mediante Leyes Nacionales y Provinciales, los cuales asignan recursos para ejecutar planes sanitarios, como el Plan Nacional de Control de Brucelosis Caprina, teniendo como objetivo reducir el impacto negativo de la infección por *B. melitensis* en la salud pública y en los rodeos caprinos. Las estrategias sanitarias son (SENASA, 2017):

- Zona endémica (enfermedad presente en animales y casos autóctonos en humanos).
 - ✓ Vacunación masiva, vacuna *B. melitensis* Rev. 1 por vía conjuntival, cada dos años en cada establecimiento.
 - ✓ Hembras caprinas no gestantes – hembras ovinas no gestantes que cohabitan con caprinos.
 - ✓ Hembras gestantes durante el primer y último mes de gestación.
 - ✓ Machos no vacunar si tienen destino a faena inmediata.
- Zona enzoótica (enfermedad presente en animales y no se registraron casos autóctonos en humanos). Se implementan diversas estrategias al ser evaluados los riesgos en salud pública.
 - ✓ Vacunar masivamente.
 - ✓ Vacunar reposición (cabrillona) una vez por año y si hay dos pariciones, dos veces por año.
 - ✓ Vacunar unidades productivas infectadas.
 - ✓ Realizar diagnóstico serológico periódico de animales susceptibles.
 - ✓ Eliminación por sacrificio o faena de los reactores positivos.
 - ✓ Desinfección de instalaciones infectadas.
- Zonas libres (con o sin vacunación)
 - ✓ Corroborada por muestreos serológicos.
 - ✓ Eficaz sistema de prevención y vigilancia epidemiológica.

Realizar un muestreo de sangre una vez por año a todos los animales adultos del hato, tanto hembras como machos, descartando todos los animales positivos. En caso de que sea un animal que ingresa por primera vez al establecimiento deberá ser aislado en un corral y controlado mediante sangrado, se realizarán dos pruebas

serológicas, ejecutadas con un intervalo de 30 a 45 días, aquellos resultados negativos permitirán el ingreso del animal. Los resultados serológicos positivos harán que se descarten los animales infectados y su destino será a faena.

Los establecimientos libres deberán contar con dos resultados serológicos negativos consecutivos de la totalidad de los reproductores ovinos y caprinos mayores de seis meses de edad, con intervalo de 90 a 180 días entre ellos, realizados en un Laboratorio de Red u Oficial (SENASA, 2017). Aquellos establecimientos infectados si la prevalencia es baja realizan 1 serología cada tres meses con descarte de positivos hasta llegar a lograr tres sangrados consecutivos negativos. Cuando la prevalencia es elevada se ejecuta una vacunación a todo el stock y luego de un año se hará muestreos serológicos cada seis meses con descarte de positivos.

Para la certificación de establecimientos libres de infección por *B. melitensis* se deberán cumplir ciertos requisitos (SENASA, 2006):

- ✓ El propietario o responsable conformó la planilla de inscripción de Establecimiento Libre.
- ✓ Se realizaron dos sangrados a todos los caprinos reproductores del hato, mayores a seis meses con intervalos de 90 a 180 días.
- ✓ Los diagnósticos arrojaron resultados 100% negativos en todos los caprinos sangrados.

Para la recertificación de establecimientos libres es el que cumple anualmente con los siguientes requisitos.

- ✓ El propietario o responsable conformó una nueva planilla de inscripción de Establecimiento Libre.
- ✓ Se realizó un sangrado a todos los caprinos reproductores del hato, mayores a seis meses de edad con resultado negativo.
- ✓ Los diagnósticos arrojaron resultados 100% negativos en todos los caprinos sangrados.

Evitar el contacto de los animales de diferentes productores o puestos, implementando la colocación de alambrados perimetrales manteniéndolos en buenas condiciones así se evitará el pasaje de animales entre establecimientos. Se deberá controlar los movimientos desde áreas infectadas y capacitar a aquellos productores de las mismas, donde sea habitual el uso de guantes o bolsas para la recolección de fetos/placentas, barbijos para retirar el guano de los corrales previamente humedecidos y

sensibilizar sobre el consumo de derivados lácteos no pasteurizados de cabras infectadas, como lo es la leche cruda, quesillos, etc.

Aquellos animales infectados al ser descartados no aseguran que los ambientes no estén contaminados, por ello debe implementarse en conjunto un plan estratégico de vacunación masiva y buen manejo. Se deberá tomar ciertos recaudos para controlar la sanidad del hato y de sus corrales, como por ejemplo: detección y eliminación de animales infectados, entierros sanitarios o destrucción de fetos abortados y sus placentas, rotación de los corrales de parición y con descanso de 6 meses.

CONCLUSIÓN:

La brucelosis caprina producida por *B. melitensis*, al ser una enfermedad infecto - contagiosa y constituyendo una de las zoonosis de mayor importancia a nivel mundial, continúa siendo un grave problema para la salud pública y las familias cabriteras.

Es primordial arribar a un diagnóstico certero de la enfermedad una vez que los animales manifestaron signos clínicos, mediante métodos indirectos (de laboratorio). En las pruebas serológicas ya mencionadas, se hizo referencia a la técnica, sensibilidad y especificidad de cada una, llegando a la conclusión que las pruebas tamiz (BPA, RB) son rápidas, prácticas, económicas y debido a su pH bajo ennoblecen la aglutinación de anticuerpos del isotipo IgG. Las pruebas confirmatorias (FPA, ELISA – C, FC, 2 ME) difieren en cuanto a su ejecución, costos y rapidez en sus resultados. Al obtener un diagnóstico confirmatorio se asignan a cada zona o región planes sanitarios con la finalidad de interrumpir el contagio entre animales y la diseminación del agente causal.

La finalidad de este trabajo es hacer un pequeño aporte sobre información actual de brucelosis caprina y sus técnicas diagnósticas de laboratorio más utilizadas a nivel provincial y nacional.

ANEXO N° 1

Notificación		Sospecha		Foco		Protocolo N°	
Provincia:				Departamento:			
Oficina local:							
Renspa N°:				Propietario:			
Establecimiento:							
Veterinario actuante:				Matricula profesional:			
Firma:							

Población:		Total		Sanos		Enfermos	
Especie:							
Fecha toma de muestras:		Muestras remitidas:					
Fecha de remisión:							
Síntomas		Lesiones		Diagnóstico presuntivo		Plan sanitario	
Solicitud de pruebas De laboratorio		Bacteriológicas		Serológicas		Otros...	
Resultados de laboratorio							

Protocolo: envío de muestras denunciadas al laboratorio (obtenido del Hospital Escuela Veterinaria – UNLaR Sede Chamental).

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Blasco, J.M. (2007). Estrategias de control de la Brucelosis caprina, infección por *B. melitensis*. Mesa caprina nacional, Provincia de San Juan. Rep. Argentina
- 2 Bedotti, D.O.; Sánchez Rodríguez, M. (2014). Aproximación a la problemática sanitaria del ganado caprino en el oeste pampeano. Sitio argentino de Producción Animal. 120 – 129.
- 3 Bionote Inc. (2008). Test ELISA para anticuerpos de *B. Brucella*. Korea.
www.bionote.co.kr
- 4 Díaz, E.; Marín, C.; Aragón, V.; Pérez – Ortiz; Pardo, M.; Blasco, J.M.; Díaz R. Moriyón, I. (1994). Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. Journal of clinical microbiology .1159 - 1165.
- 5 Di Cola, G. (2014). Toma y remisión de muestras al laboratorio para diagnóstico de problemas sanitarios. Información Veterinaria. Argentina: CMVPC.
- 6 Estein S.M. (2006). Brucelosis: inmunidad y vacunación. Revista electrónica de veterinaria vol II. España.
- 7 Fain Binda J.C; Gaia O.E; Rondelli F.M; Gherardi S; Fain Binda V; Pietronave V. (2007). Técnicas de Inmunología Diagnóstica Veterinaria. Argentina: UNR Editora. Editorial Universidad Nacional de Rosario.
- 8 Godfroid, J., et. Al. (2010). Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. Croat Med J. 51: 296 -305.
- 9 Kraft, H.; Schillinger, D., et al. (1998). Métodos de laboratorio Clínico en medicina Veterinaria de mamíferos domésticos. España: Acribia.
- 10 INTA. Robles C.; Gaido A.B; Spath E.J. (2014). Brucelosis caprina en Argentina. Ed: INTA. 5 - 19.
- 11 INTA. Robles, C.; Uzal, F.; Olaechea, F.V. (2011). Guía de muestreo para el diagnóstico de enfermedades en ovinos y caprinos. Ed: INTA.
- 12 Minas, A. (2006). Control and eradication of brucellosis in small ruminants. Small Ruminant Research Articles 62:101 – 107.

- 13 Minas, A.; Minas, M.; Stournara, A.; Tselepidis, S. (2004). The effects of Rev-1 vaccination of sheep and goats on human brucellosis. Preventive veterinary medicine 64: 41 – 47.

<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.03.007>

- 14 Moral, M. (2013). Enfermedades infecciosas Brucelosis: *Guía para el equipo de salud*, 12, 8 – 9.
- 15 OIE (2018). Manual de la OIE sobre animales terrestres. Cap. 3.1.4
- 16 Radostist, O.; Gay, C.; Blood, D.; Hinchcliff, K. (2002). Medicina Veterinaria, tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9na ed. España: Mc Graw Hill. Interamericana.
- 17 Robles, C.A. (2009). Manual Brucelosis caprina. Ed: INTA. 20- 25 – 27.
- 18 Robles, C.A. (2009). Epidemiología, diagnóstico y control de la brucelosis caprina. 32° Congreso Argentino de Producción Animal.
- 19 Robles, C.A. (2001). Protocolo de ELISA indirecto para la detección y medición de anticuerpos contra *Brucella ovis* en suero de ovinos. Ed: INTA Bariloche. 4.
- 20 Segovia, C.N.; Uzal, F.A. y Robles, C.A. (2000). Evaluación de un enzimoimmunoensayo indirecto para la detección de anticuerpos contra *Brucella melitensis* en suero de caprinos. Therios 29: 177 – 182.
- 21 Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2000). Manual de diagnóstico serológico de brucelosis bovina.
- 22 Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria; OIE (2009). Manual de diagnóstico serológico de brucelosis bovina. Versión 3.0/2009. Nicola, A. y Elena, S.
- 23 Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2005). Manual de Procedimientos Recolección y envío de muestras. Dirección Nacional de Sanidad Animal.
- 24 Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2006). Manual de Procedimientos de Establecimientos Libres de enfermedad. Sitio Argentino de Producción Animal.
- 25 Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2017). Resolución – 372-2017- SENASA.

<http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-372-2017-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>

26 Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2019). Resolución – 67-2019- SENASA.

<http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-67-2019-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>

27 Trezeguet, M. A. (2010). Producción caprina. Argentina: Edición del autor.